

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-317790
 (43)Date of publication of application : 03.12.1996

(51)Int. Cl. C12N 15/09
 C07H 21/04
 C12Q 1/68

(21)Application number : 07-124852 (71)Applicant : TOAGOSEI CO LTD
 (22)Date of filing : 24.05.1995 (72)Inventor : SUGIMOTO NAOKI

(54) STABLE ANALYSIS OF COMPLEMENTARY BASE PAIR STRUCTURE OF OLIGORIBONUCLEOTIDE/OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDE

(57)Abstract:

PURPOSE: To estimate the stability of the subject complementary base pair structure by obtaining the change of enthalpy, entropy or free energy followed by formation of a complementary base pair structure of an oligo NRA and a complementary oligo DNA by a nearest-neighbor base parameter.

CONSTITUTION: The stability of a complementary base pair structure of an oligo RNA/an oligo DNA is estimated by obtaining the change of an enthalpy (ΔH°), entropy (ΔS°) or free energy (ΔG°) followed by the formation of the complementary base pair structure of an oligoribonucleotide of the formula N1, N2...Nn and an oligodeoxyribonucleotide having a base sequence complementary with it according to formula II [N is four kinds of bases A, G, C and U constituting the oligoribonucleotide; (i) is 1, 2,...n; (n) is a positive integer; X(NiNi+1) is a parameter value of formula I against the change of ΔH° , ΔS° or ΔG° followed by the formation of the complementary base pair structure of an oligoribonucleotide NiNi+1.) of a dimer and the nucleotide; Y is a starting value.] by using a nearest-neighbor base parameter of formula I.

配 対	ΔH°	ΔS°	ΔG°
rAA/dTT	-7.5	-21.9	1.0
rAT/dAT	-8.9	-22.3	2.7
rAG/dCT	-9.1	-24.6	-1.3
rGU/dAT	-8.3	-24.9	0.3
rAA/dTC	-9.0	-26.1	0.3
rTC/dAG	-9.3	-25.5	-2.1
rCG/dGC	-16.3	-44.3	-1.7
rUA/dAU	7.0	18.7	-6.9
rGA/dTC	-3.5	-13.5	1.3
rUA/dAU	8.0	-17.1	-2.7
rGU/dGC	-14.2	-31.9	2.9
rAU/dAU	7.4	-21.6	-1.1
rUA/dAU	-7.6	-21.2	0.3
rUC/dUA	-8.6	-22.9	-1.5
rCG/dCA	-10.7	-24.4	-1.5
rU/dAA	11.5	26.4	-7.2
初 値	1.0	-4.9	3.1

式 II (NiNi+1) の Y

II

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 16.08.2001
 [Date of sending the examiner's decision of rejection]
 [Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
 [Date of final disposal for application]
 [Patent number]
 [Date of registration]
 [Number of appeal against examiner's decision of rejection]
 [Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
 [Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-317790

(43)公開日 平成8年(1996)12月3日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 Q 1/68		9453-4B	C 1 2 Q 1/68	A

審査請求 未請求 請求項の数2 O L (全 11 頁)

(21)出願番号	特願平7-124852	(71)出願人	000003034 東亜合成株式会社 東京都港区西新橋1丁目14番1号
(22)出願日	平成7年(1995)5月24日	(72)発明者	杉本 直己 神戸市東灘区魚崎中町4-9-29 サンヴ ィラ魚崎1C
		(74)代理人	弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54)【発明の名称】 オリゴリボヌクレオチド／オリゴデオキシリボヌクレオチド相補塩基対構造の安定性解析方法

(57)【要約】

【目的】 オリゴリボヌクレオチドとそれに相補なオリゴデオキシリボヌクレオチドとが相補塩基対構造を形成するときの構造安定性を高精度で予測する方法を提供する。

【構成】 $N_1 N_2 \cdots N_n$ で表されるオリゴリボヌクレオチドとそれに相補的な塩基配列をもつオリゴデオキシリボヌクレオチドとの相補塩基対構造の形成に伴うエンタルピー、エントロピー又は自由エネルギーの変化を、本発明によって与えられるパラメータの値 $X (N_i N_{i+1}) (i=1, 2, \cdots, n-1)$ 及び補正項 Y の値を用いて次式に従って求める。

$$\sum \{X (N_i N_{i+1})\} + Y$$

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 表1に示す最近接塩基対パラメータを用いて、 $N_1 N_2 \cdots N_n$ で表されるオリゴリボヌクレオチドとそれに相補的な塩基配列をもつオリゴデオキシリボヌクレオチドとの相補塩基対構造の形成に伴うエンタ*

*ルビー、エントロピー又は自由エネルギーの変化を次式(1)に従って求めることを特徴とするオリゴリボヌクレオチド／オリゴデオキシリボヌクレオチドの相補塩基対構造の構造安定性を予測する方法。

$$\sum_{i=1}^{n-1} \{X(N_i N_{i+1})\} + Y \quad (1)$$

但し、 N_i ($i=1, 2, \dots, n$; n は正整数)は、オリゴリボヌクレオチドを構成する4種の塩基A, G, C, Uのいずれかを表し、 $X(N_i N_{i+1})$ ($i=1, 2, \dots, n-1$)は、2量体のオリゴリボヌクレオチド $N_i N_{i+1}$ と該ヌクレオチドの塩基配列に相補的な2量体のオリゴデオキシリボヌクレオチドとの相補塩基対構造形成に伴うエンタルピー、エントロピー又は自由エネルギーの変化に対する表1に示すパラメータの値である。 Σ で示す和は、 $X(N_1 N_2)$, $X(N_2 N_3)$, \dots , $X(N_{n-1} N_n)$ の(n ※

※-1)個の和をとることを意味する。また、 Y はエンタルピー、エントロピー、もしくは自由エネルギーの変化をそれぞれ求める際にそれぞれに用いられる、表1中に開始と表示されている値である。表1において、 r はリボヌクレオチドを、 d はデオキシリボヌクレオチドを表し、塩基の並び方は、はじめが5'末端側、あとが3'末端側を表し、表1に示した値の単位は、 ΔH° が kcal mol^{-1} 、 ΔS° が $\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ 、 ΔG°_{37} が kcal mol^{-1} である。

〔表1〕

配 列	ΔH°	ΔS°	ΔG°_{37}
rAA/dTT	-7.8	-21.9	-1.0
rAC/dGT	-5.9	-12.3	-2.1
rAG/dCT	-9.1	-23.5	-1.8
rAU/dAT	-8.3	-23.9	-0.9
rCA/dTG	-9.0	-26.1	-0.9
rCC/dGG	-9.3	-23.2	-2.1
rCG/dCG	-16.3	-47.1	-1.7
rCU/dAG	-7.0	-19.7	-0.9
rGA/dTC	-5.5	-13.5	-1.3
rGC/dGC	-8.0	-17.1	-2.7
rGG/dCC	-12.8	-31.9	-2.9
rGU/dAC	-7.8	-21.6	-1.1
rUA/dTA	-7.8	-23.2	-0.6
rUC/dGA	-8.6	-22.9	-1.5
rUG/dCA	-10.4	-28.4	-1.6
rUU/dAA	-11.5	-36.4	-0.2
開 始	1.9	-3.9	3.1

【請求項2】 請求項1に記載したオリゴリボヌクレオチド／オリゴデオキシリボヌクレオチドの相補塩基対構造の構造安定性を予測する方法において、前記 $X(N_i N_{i+1})$ ($i=1, 2, \dots, n-1$)及び Y の値として表1に示した数値の代わりに表2に示した最大数値と最小数値の間の数値を用いることを特徴とするオリゴリボヌクレオチド／オリゴデオキシリボヌクレオチドの相補塩基対構造

の構造安定性を予測する方法。なお、表2において、 r はリボヌクレオチドを、 d はデオキシリボヌクレオチドを表し、塩基の並び方は、はじめが5'末端側、あとが3'末端側を表し、表2に示した値の単位は、 ΔH° が kcal mol^{-1} 、 ΔS° が $\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ 、 ΔG°_{37} が kcal mol^{-1} である。

〔表2〕

配 列	ΔH°	ΔS°	ΔG°_{37}
rAA/dTT	-8.1~-7.5	-23.2~-20.6	-1.1~-0.9
rAC/dGT	-6.2~-5.6	-13.6~-11.0	-2.2~-2.0
rAG/dCT	-9.4~-8.8	-24.8~-22.2	-1.9~-1.7

3

4

rAU/dAT	-8.6~-8.0	-25.2~-22.6	-1.0~-0.8
rCA/dTG	-9.3~-8.7	-27.4~-24.8	-1.0~-0.8
rCC/dGG	-9.6~-9.0	-24.5~-21.9	-2.2~-2.0
rCG/dCG	-16.6~-16.0	-48.4~-45.8	-1.8~-1.6
rCU/dAG	-7.3~-6.7	-21.0~-18.4	-1.0~-0.8
rGA/dTC	-5.8~-5.2	-14.8~-12.2	-1.4~-1.2
rGC/dGC	-8.3~-7.7	-18.4~-15.8	-2.8~-2.6
rGG/dCC	-13.1~-12.5	-33.2~-30.6	-3.0~-2.8
rGU/dAC	-8.1~-7.5	-22.9~-20.3	-1.2~-1.0
rUA/dTA	-8.1~-7.5	-24.5~-21.9	-0.7~-0.5
rUC/dGA	-8.9~-8.3	-24.2~-21.6	-1.6~-1.4
rUG/dCA	-10.7~-10.1	-29.7~-27.1	-1.7~-1.5
rUU/dAA	-11.8~-11.2	-37.7~-35.1	-0.3~-0.1
開 始	1.6~2.2	-5.2~-2.6	3.0~3.2

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、オリゴリボヌクレオチド又はRNAがそれに相補なオリゴデオキシリボヌクレオチド又はDNAと相補塩基対構造を形成するときの安定性を予測する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】オリゴリボヌクレオチド又はRNAがそれに相補なオリゴデオキシリボヌクレオチド又はDNAと相補塩基対構造を形成するときの安定性、すなわち結合の強さを予測することは、アンチセンス核酸医薬の開発や、核酸をターゲットとした診断・検出方法の開発等の観点から重要である。

【0003】オリゴリボヌクレオチドどうしの相補塩基対構造の安定性の予測は、オリゴリボヌクレオチドどうしが相補塩基対構造を形成するときの最近接塩基対パラメータを用いて行うことができ (S. M. Freier et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83巻, 9373-9377頁(1986); D.H. Turner, N. Sugimoto, S. M. Freier, Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 17巻, 167-192頁(1988))、その有用性が認められている (杉本直己, 生物物理 33巻, 61-67頁(1993))。

【0004】オリゴデオキシリボヌクレオチドどうしの相補塩基対構造の安定性の予測も、オリゴデオキシリボヌクレオチドどうしが相補塩基対構造を形成するときの最近接塩基対パラメータを用いて同様に行うことができる (K. J. Breslauer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83巻, 3746-3750頁(1986))。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかし、オリゴリボヌクレオチドとオリゴデオキシリボヌクレオチドとの相補塩基対構造の安定性の予測については、T.D. Yager and *

* P.H. von Hippelの方法 (Biochemistry 30巻, 1097-1118頁(1991))があるが、そこで提案されているパラメータはすべてが実験事実に基づくものではなく、またこの方法で求めた予測値は実験値からのずれが大きい。本発明は、オリゴリボヌクレオチドとそれに相補なオリゴデオキシリボヌクレオチドとが相補塩基対構造を形成するときの構造安定性を高精度で予測する方法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明においては、最近接塩基対モデルを用いてオリゴリボヌクレオチドとそれに相補的な塩基配列をもつオリゴデオキシリボヌクレオチドとの相補塩基対構造の形成に伴うエンタルピー、エントロピー又は自由エネルギーの変化を求め、その変化に基づいてRNA/DNAの任意の長さの相補塩基対構造の構造安定性を予測する。安定性は、例えば、相補塩基対構造の形成に伴うエンタルピーの変化 (エンタルピー変化が負の値で絶対値が大きいほど安定)、エントロピー変化 (エントロピー変化が正の値で絶対値が大きいほど安定)、自由エネルギー変化 (自由エネルギー変化が負の値で絶対値が大きいほど安定) によって予測することができる。特に、そのような変化が起こるかかどうかは自由エネルギー変化が負の値をとる (負の値をとるときそのような変化が起こる) かどうかによって決まる。

【0007】 $N_1 N_2 \cdots N_n$ で表されるオリゴリボヌクレオチドとそれに相補的な塩基配列をもつオリゴデオキシリボヌクレオチドとの相補塩基対構造の形成に伴うエンタルピー、エントロピー又は自由エネルギーの変化は次式(1)に従って求められる。

【0008】

$$\sum_{i=1}^{n-1} \{X(N_i N_{i+1})\} + Y \quad (1)$$

【0009】但し、 N_i ($i=1, 2, \dots, n$; n は正整数) は、オリゴリボヌクレオチドを構成する4種の塩基A,

5

6

G, C, Uのいずれかを表し、 $X(N_i N_{i+1})$ ($i=1, 2, \dots, n-1$) は、2量体のオリゴヌクレオチド $N_i N_{i+1}$ と該ヌクレオチドの塩基配列に相補的な2量体のオリゴデオキシリボヌクレオチドとの相補塩基対構造形成に伴うエンタルピー、エントロピー又は自由エネルギーの変化に対するパラメータの値である。 Σ で示す和は、 $X(N_1 N_2), X(N_2 N_3), \dots, X(N_{n-1} N_n)$ の $(n-1)$ 個の和をとることを意味する。また、Yは最初の塩基対生成に関連するエンタルピー、エントロピー、もしくは自由エネルギーの補正項(開始)である。

【0010】本発明では、最近接塩基対モデルに有効な*

*16種類のジリボヌクレオチド/ジデオキシリボヌクレオチド塩基対及び開始因子に対するエンタルピー変化(ΔH° で示す)、エントロピー変化(ΔS° で示す)、及び自由エネルギー変化(ΔG°_{37} で示す)の値として、表1に示す値を用いる。表1において、rはリボヌクレオチドを、dはデオキシリボヌクレオチドを表し、塩基の並び方は、はじめが5'末端側、あとが3'末端側を表す。また、表1に示した値の単位は ΔH° が kcal mol^{-1} 、 ΔS° が $\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ 、 ΔG°_{37} が kcal mol^{-1} である。

【0011】

〔表1〕

配列	ΔH°	ΔS°	ΔG°_{37}
rAA/dTT	-7.8	-21.9	-1.0
rAC/dGT	-5.9	-12.3	-2.1
rAG/dCT	-9.1	-23.5	-1.8
rAU/dAT	-8.3	-23.9	-0.9
rCA/dTG	-9.0	-26.1	-0.9
rCC/dGG	-9.3	-23.2	-2.1
rCG/dCG	-16.3	-47.1	-1.7
rCU/dAG	-7.0	-19.7	-0.9
rGA/dTC	-5.5	-13.5	-1.3
rGC/dGC	-8.0	-17.1	-2.7
rGG/dCC	-12.8	-31.9	-2.9
rGU/dAC	-7.8	-21.6	-1.1
rUA/dTA	-7.8	-23.2	-0.6
rUC/dGA	-8.6	-22.9	-1.5
rUG/dCA	-10.4	-28.4	-1.6
rUU/dAA	-11.5	-36.4	-0.2
開始	1.9	-3.9	3.1

【0012】また、表1に示す値の代わりに次の表2に示す範囲の値を用いても、あるいは表1に示す値の $\pm 10\%$ の範囲内の値を用いても、精度は若干低下するものの充分満足すべき精度でオリゴヌクレオチド/オリ

ゴデオキシリボヌクレオチドの相補塩基対構造の安定性を予測することができる。

【0013】

〔表2〕

配列	ΔH°	ΔS°	ΔG°_{37}
rAA/dTT	-8.1~-7.5	-23.2~-20.6	-1.1~-0.9
rAC/dGT	-6.2~-5.6	-13.6~-11.0	-2.2~-2.0
rAG/dCT	-9.4~-8.8	-24.8~-22.2	-1.9~-1.7
rAU/dAT	-8.6~-8.0	-25.2~-22.6	-1.0~-0.8
rCA/dTG	-9.3~-8.7	-27.4~-24.8	-1.0~-0.8
rCC/dGG	-9.6~-9.0	-24.5~-21.9	-2.2~-2.0
rCG/dCG	-16.6~-16.0	-48.4~-45.8	-1.8~-1.6
rCU/dAG	-7.3~-6.7	-21.0~-18.4	-1.0~-0.8
rGA/dTC	-5.8~-5.2	-14.8~-12.2	-1.4~-1.2
rGC/dGC	-8.3~-7.7	-18.4~-15.8	-2.8~-2.6
rGG/dCC	-13.1~-12.5	-33.2~-30.6	-3.0~-2.8
rGU/dAC	-8.1~-7.5	-22.9~-20.3	-1.2~-1.0

7

8

rUA/dTA	-8.1~-7.5	-24.5~-21.9	-0.7~-0.5
rUC/dGA	-8.9~-8.3	-24.2~-21.6	-1.6~-1.4
rUG/dCA	-10.7~-10.1	-29.7~-27.1	-1.7~-1.5
rUU/dAA	-11.8~-11.2	-37.7~-35.1	-0.3~-0.1
開始	1.6~2.2	-5.2~-2.6	3.0~3.2

【0014】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。試料として用いる5~12塩基からなるオリゴリボヌクレオチド及びオリゴデオキシリボヌクレオチドを、固相法を利用したホスホロアミダイト法で合成した (F. Eckstein 編、Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press, 1991年; S. Agrawal 編、Methods in Molecular Biology 20巻 Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Humana Press, 1993年)。合成で得られた試料は、逆相タイプのセップバックカートリッジ (C-18 Sep-Pakカートリッジ、Waters社製) を用いて精製・脱塩し、以下の実験に用いた。

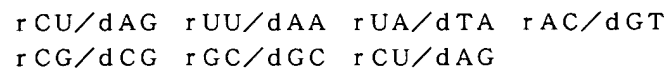
【0015】緩衝液には、組成が1M NaCl/10mM Na₂HPO₄/1mM Na₂EDTAからなり、その液性がpH 7.0であるものを用いた。オリゴリボヌクレオチド及びオリゴデオキシリボヌクレオチドの濃度は、報告されているモノヌクレオチド及びジヌクレオチドの分子吸光係数 [E. G. Richards, Handbook of Biochemistry and Molecular Biology: Nucleic Acids (C. D. Fasman ed.) 3rd ed., Vol. I, p197, CRC Cleveland OH.] をもとに、最近接近似法を用いる方法 [N. Sugimoto et al., Biochemistry 25巻、5755-5759頁 (1986)] に従って、90℃で決定した。オリゴリボヌクレオチド及びそれに相補なオリゴデオキシリボヌクレオチドは、緩衝液中でそれぞれの濃度が同じになるように混合し *

$$T_m^{-1} = \{R \ln (C_i/4) + \Delta S^\circ\} / \Delta H^\circ \quad (2)$$

すなわち、 T_m^{-1} の値を $\ln (C_i/4)$ の値に対してプロットすることにより、 ΔH° と ΔS° の値を算出した。また、 ΔH° と ΔS° の値を、次式(3)に代入す※

$$\Delta G^\circ_{37} = \Delta H^\circ - (37.0 + 273.15) \Delta S^\circ \quad (3)$$

【0018】最初に、最近接塩基対の考えが、オリゴリボヌクレオチド及びそれに相補なオリゴデオキシリボヌクレオチドからなる二重鎖形成に有効であることを確認するために、オリゴリボヌクレオチドとそれに相補なオリゴデオキシリボヌクレオチドの塩基対の配列順序を入れ換えてもそれを構成するジリボヌクレオチドとジデオキシリボヌクレオチドの塩基対が変化しないような場合について調べた。例えば、



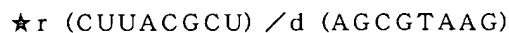
【0019】ここで、rはリボヌクレオチドを、dはデオキシリボヌクレオチドを表し、塩基のならば方は、はじめが5'末端側、あとが3'末端側を表している。図

*た。

【0016】上記の緩衝液中にオリゴリボヌクレオチド及びそれに相補なオリゴデオキシリボヌクレオチドを同濃度ずつ含む溶液を、紫外光測定用のセルに入れ、紫外光領域での吸光度を分光光度計 (日立製作所製U-3200及びU-3210) で測定した。特に、そこに含まれる相補核酸鎖どうしの会合・解離状態の温度依存性を調べるために、試料を含む緩衝液の260nmにおける種々の温度における吸光度を、毎分0.5又は1.0℃の割合で温度を変化させながら追跡した。この際、日立製作所製のSPR-7又はSPR-10温度プログラマーを用いた。また、必要に応じ、乾燥窒素を流すことにより水滴の付着を阻止した。得られたデータをNEC社製のPC-9801コンピュータを用い、適当な方法で最適化し、しかる後に融解温度 (T_m) を既に報告した方法 [M. Petersheim and D. H. Turner, Biochemistry 22巻、256-263頁 (1983); N. Sugimoto et al., Chem. Lett. 9-12頁 (1991)] に従って決定した。

【0017】そして、Turnerらによる次式(2) [D. H. Turner et al., Landolt-Börnstein Nucleic Acids (W. R. Saenger編) 1c巻 3.6章 Berlin Germany (1990)] を利用して、相補塩基対構造の形成に伴うエンタルピー変化 (ΔH° で表す) 及びエントロピー変化 (ΔS° で表す) を算出した。式中 C_i はオリゴリボヌクレオチド及びオリゴデオキシリボヌクレオチドの総濃度、Rは気体定数である。

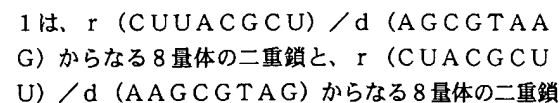
※ることにより37℃における自由エネルギー変化 (ΔG°_{37} で表す) の値を求めた。



からなる8量体の二重鎖 [ここでr(CUUACGCU)及びd(AGCGTAAG)ともに始めが5'端、最後が3'端である] と



からなる8量体の二重鎖とは、それらを構成するジリボヌクレオチド又はジデオキシリボヌクレオチドは、ともに次の7種で表される。



9

10

について、実験で得られた結果を(2)式に従ってプロットしたものである。すなわち、様々なオリゴリボヌクレオチド濃度、もしくは様々なオリゴデオキシリボヌクレオチド濃度で行った場合について、それらの総濃度を C_t としたとき、融解温度の逆数を1000倍した値に対して $C_t/4$ の常用対数の値をプロットしたものである。図中、(◆)は r (CUACGCUU)/ d (AAGCGTAG) に対するプロットであり、(+)は r (CUUACGCU)/ d (AGCGTAAG) に対するプロットである。

*【0020】図1及び前記(2)、(3)式により、それぞれについてその ΔH° 、 ΔS° 、 ΔG°_{37} 、及び T_m を求めたところ、両者の差は各々3.8%、3.3%、6.1%及び2.7℃にすぎず、非常に小さかった。この他にも、構造の類似している5対の二重鎖について両者の ΔH° 、 ΔS° 、 ΔG°_{37} 、及び T_m を測定して比較した。それらの結果をまとめて表3に示す。各パラメータの単位は、 ΔH° が kcal mol^{-1} 、 ΔS° が $\text{cal mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ 、 ΔG°_{37} が kcal mol^{-1} 、 T_m が℃である。

*10 【0021】

〔表3〕

対番号	ハイブリッド二重鎖	ΔH°	ΔS°	ΔG°_{37}	T_m
[1]	r (CUACGCUU)/ d (AAGCGTAG)	-54.3	-153	-6.8	38.9
	r (CUUACGCU)/ d (AGCGTAAG)	-52.3	-148	-6.4	36.2
[2]	r (ACCGCA)/ d (TGGGT)	-45.4	-126	-6.4	36.1
	r (GCACCG)/ d (CGGTGC)	-49.7	-141	-6.2	34.8
[3]	r (CACGGC)/ d (GCCGTG)	-48.9	-135	-6.9	39.5
	r (GGCAGC)/ d (CGTGCC)	-51.8	-144	-7.3	41.5
[4]	r (AAGCGUAG)/ d (CTACGCTT)	-67.2	-192	-7.8	43.1
	r (AGCGUAAG)/ d (CTTACGCT)	-60.1	-170	-7.3	41.1
[5]	r (AGUCCUGA)/ d (TCAGGACT)	-54.7	-155	-6.7	37.9
	r (CUGAGUCC)/ d (GGACTCAG)	-60.8	-171	-7.8	43.4
[6]	r (GAGCCGUG)/ d (CACGGCTC)	-67.3	-187	-9.5	51.4
	r (GCCGUGAG)/ d (CTCACGGC)	-71.4	-199	-9.7	51.4

【0022】測定誤差は、 ΔH° が±4%、 ΔS° が±4%、 ΔG°_{37} が±8%、 T_m が±2%である。融解温度 T_m は、オリゴリボヌクレオチドとオリゴデオキシリボヌクレオチドの総濃度を100 μM として計算した。表3から明かなように、[1]～[6]の各対における ΔH° 、 ΔS° 、 ΔG°_{37} 及び T_m の差異は平均的にみて実験誤差を大きく越えるものではない。これらの結果から、最近接塩基対モデルは、オリゴリボヌクレオチド/オリゴデオキシリボヌクレオチドの場合にも有効であることが分かる。

【0023】このようにして最近接塩基対モデルの有効性を確認したうえで、前述の方法で64種類のオリゴリボヌクレオチド/オリゴデオキシリボヌクレオチドの相補塩基対について、前記と同様の方法で各塩基対形成に

対する ΔH° 、 ΔS° 、 ΔG°_{37} 及び T_m の値を測定した。結果を表4に示す。また、表中「CACAG」から「GUUGGUUGGUUG」までの最後の6種のRNA配列の測定値は、Hall et al. Biochemistry 30, 10606-10613(1991)及び Ratmeyer et al. Biochemistry 30, 5298-5304(1994) によるものである。表4中のカッコ内の数値については後述する。各数値の単位は、 ΔH° が kcal mol^{-1} 、 ΔS° が $\text{cal mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ 、 ΔG°_{37} が kcal mol^{-1} 、 T_m が℃である。なお、表4の左欄は、相補塩基対を形成するオリゴリボヌクレオチドのみを示している。従って、例えば第4表の第1行の数値は、 r (AGCCG)/ d (CGGCT) 形成時の各パラメータの変化を表す。

【0024】

〔表4〕

オリゴリボヌクレオチド配列	ΔH°	ΔS°	ΔG°_{37}	T_m
AGCCG	-41.6(-40.8)	-116(-115)	-5.7(-5.2)	30.8(27.2)
CGGCU	-45.8(-42.2)	-132(-120)	-4.9(-5.1)	26.1(26.7)
GGUGG	-46.0(-41.9)	-132(-118)	-5.2(-5.4)	28.0(28.8)

11				12
ACCGCA	-45.4(-46.6)	-126(-130)	-6.4(-6.4)	36.1(36.0)
CAAUUG	-46.7(-48.1)	-140(-146)	-3.3(-2.9)	16.9(15.1)
CACGGC	-48.9(-50.1)	-135(-138)	-6.9(-7.2)	39.5(41.0)
CGAUUG	-49.3(-50.1)	-151(-153)	-2.6(-2.6)	14.1(14.4)
CGGUGC	-48.9(-53.4)	-135(-150)	-7.0(-6.9)	40.1(39.0)
CGUGCC	-49.3(-49.9)	-139(-141)	-6.3(-6.1)	35.3(34.2)
GCACCG	-49.7(-46.6)	-141(-130)	-6.2(-6.4)	34.8(36.0)
GGCACG	-51.8(-50.1)	-144(-138)	-7.3(-7.2)	41.5(41.0)
AAUACCG	-54.1(-53.5)	-160(-156)	-4.7(-5.3)	26.6(29.9)
ACGUUG	-58.3(-54.6)	-172(-160)	-5.0(-4.9)	29.6(27.8)
AGCUUCA	-55.6(-51.3)	-164(-150)	-4.7(-4.9)	26.2(27.5)
CACGGCU	-53.9(-57.1)	-147(-158)	-8.5(-8.1)	48.6(45.6)
CAUACGU	-53.2(-53.2)	-158(-158)	-4.3(-4.2)	24.5(23.8)
GGACUUA	-43.8(-48.6)	-125(-141)	-4.9(-4.9)	25.9(26.9)
UAAGUCC	-46.2(-48.5)	-132(-140)	-5.4(-5.0)	29.4(27.6)
UGAAGCU	-43.0(-45.9)	-118(-128)	-6.4(-6.2)	36.5(34.8)
AAAAAAA	-54.0(-52.7)	-162(-157)	-3.8(-3.9)	22.1(22.5)
AAGCGUAG	-67.2(-64.0)	-192(-182)	-7.8(-7.6)	43.1(42.3)
AAUCCAGU	-55.9(-58.0)	-161(-167)	-6.1(-6.2)	34.5(35.3)
AAUGUCGC	-64.9(-65.3)	-186(-187)	-7.2(-7.4)	39.9(41.0)
ACCUAGUC	-56.0(-53.6)	-159(-150)	-6.9(-7.0)	39.2(39.7)
ACGACCUC	-55.0(-56.6)	-150(-155)	-8.6(-8.6)	48.9(48.5)
ACUGGAUU	-57.8(-59.5)	-163(-170)	-7.2(-6.8)	40.9(38.3)
AGCGUAA	-60.1(-64.0)	-170(-182)	-7.3(-7.6)	41.1(42.3)
AGUCCUGA	-54.7(-55.8)	-155(-157)	-6.7(-7.2)	37.9(40.8)
CAACAGCA	-52.7(-55.9)	-145(-157)	-7.8(-7.2)	44.8(40.8)
CACGGCUC	-71.6(-65.7)	-200(-181)	-9.6(-9.6)	50.5(52.0)
CGCUGUAA	-60.4(-63.2)	-172(-183)	-7.2(-6.5)	40.2(36.7)
CUACGCUU	-54.3(-61.6)	-153(-179)	-6.8(-6.0)	38.9(34.2)
CUAGUGGA	-63.4(-58.5)	-178(-166)	-8.3(-7.1)	45.1(40.1)
CUCACGGC	-70.3(-65.7)	-196(-181)	-9.6(-9.6)	51.0(52.0)
CUGAGUCC	-60.8(-55.8)	-171(-157)	-7.8(-7.2)	43.4(40.8)
CUUACGCU	-52.3(-61.6)	-148(-179)	-6.4(-6.0)	36.2(34.2)
GACUAGGU	-57.0(-54.0)	-158(-150)	-8.1(-7.6)	45.9(43.3)
GAGCCGUG	-67.3(-64.5)	-187(-178)	-9.5(-9.2)	51.4(50.4)
GAGGUCGU	-71.9(-66.0)	-202(-186)	-9.2(-8.3)	48.9(45.6)
GCCAGUUA	-62.9(-60.6)	-180(-175)	-7.2(-6.3)	40.0(35.9)
GCCGUGAG	-71.4(-64.5)	-199(-178)	-9.7(-9.2)	51.4(50.4)
GCGACAUU	-60.6(-62.6)	-170(-180)	-7.9(-6.7)	43.9(37.7)
UAACUGGC	-62.6(-57.8)	-174(-158)	-8.6(-8.7)	47.7(48.9)
UCCACUAG	-64.1(-54.8)	-184(-155)	-6.9(-6.8)	38.6(38.5)
UGCUGUUG	-52.0(-63.6)	-146(-184)	-6.7(-6.6)	38.3(37.2)
UGUUCGAC	-66.2(-64.1)	-190(-186)	-7.4(-6.4)	41.3(36.3)
UUACACGG	-58.4(-65.7)	-166(-190)	-7.0(-6.9)	39.5(38.7)
UUGGCACC	-56.2(-65.0)	-153(-179)	-8.7(-9.4)	49.8(51.3)
AUAACUGGC	-60.7(-66.1)	-168(-182)	-8.7(-9.6)	48.7(51.9)
AUCUAUCCG	-59.9(-72.3)	-171(-210)	-6.8(-7.0)	38.4(38.8)
CAACAGCAA	-63.3(-63.7)	-177(-179)	-8.7(-8.2)	47.8(45.4)
CAACAGCAU	-71.0(-64.2)	-200(-181)	-9.0(-8.1)	48.1(44.7)
CGCUGUUAC	-71.5(-72.8)	-205(-210)	-8.2(-7.8)	44.2(42.3)

13				14
CGCUGUAG	-67.7(-76.0)	-193(-221)	-8.0(-7.5)	44.0(41.0)
CUAACAGCG	-70.8(-69.0)	-199(-195)	-9.0(-8.6)	48.1(46.5)
GCCAGUUA	-63.1(-68.4)	-179(-197)	-7.7(-7.3)	42.7(40.7)
GUAACAGCG	-77.5(-69.8)	-221(-197)	-9.1(-8.8)	47.8(47.4)
UUAACUGGC	-67.3(-69.3)	-189(-195)	-8.9(-8.9)	48.3(47.9)
ACGUUUUAGC	-95.4(-90.2)	-279(-261)	-9.1(-9.3)	45.6(46.6)
GCAUAAUACGU	-97.3(-85.1)	-282(-244)	-10.0(-9.4)	48.4(47.7)
AAUGGAUUACAA	-90.7(-93.2)	-260(-267)	-10.2(-10.3)	50.2(50.1)
AUUGGAUACAAA	-93.6(-93.2)	-267(-267)	-10.8(-10.3)	51.9(50.1)
GUCAGAAUCUG	-79.8(-93.0)	-220(-260)	-11.4(-12.3)	57.4(57.5)
UUGUAAUCCAUU	-76.9(-98.4)	-221(-292)	-8.5(-7.9)	45.4(41.4)
CACAG	-31.3(-31.1)	-90.6(-91.9)	-3.2(-2.6)	7.2(2.2)
CUGUG	-31.0(-33.7)	-90.6(-102)	-2.9(-2.1)	4.5(0.7)
CAACCAACCAAC	-117(-84.8)	-326(-231)	-15.9(-13.1)	64.0(63.0)
CUUCCUUCUUC	-73.8(-98.0)	-206(-287)	-9.9(-8.9)	51.9(44.7)
GAAGGAAGGAAG	-108(-90.9)	-292(-244)	-17.4(-15.0)	71.8(69.3)
GUUGGUUGGUUG	-112(-112.8)	-311(-327)	-15.5(-11.4)	64.1(51.0)

【0025】測定誤差は、 ΔH° が $\pm 4\%$ 、 ΔS° が $\pm 4\%$ 、 ΔG°_{37} が $\pm 8\%$ 、 T_m が $\pm 2\%$ である。融解温度 T_m は、オリゴリボヌクレオチドとオリゴデオキシリボヌクレオチドの総濃度を $100\mu M$ として計算した。これらの測定値を基に、非線形最小自乗法によって16種類のジリボヌクレオチド/ジデオキシリボヌクレオチド塩基対及び開始因子に対する ΔH° 、 ΔS° 、 ΔG°_{37} の値を求めた。その結果が前述の表1である。

【0026】次に、表1に示した本発明による最近接パラメータ及び開始の値を用いて、各塩基対形成に対する ΔH° 、 ΔS° 、 ΔG°_{37} 及び T_m の値を前記(1)式に基づいて計算した。例えば、表中の「AGCCG」、すなわち相補塩基対r(AGCCG)/d(CGGCT)は、次のような最近接塩基対の和によって表される。

$$r(AGCCG)/d(CGGCT) = r(AG)/d(CT) + r(GC)/d(GC) + r(CC)/d(GG) + r(CG)/d(CG)$$

このことから、この相補塩基対形成に伴うエンタルピー変化 ΔH° は表1のパラメータ値を用いて次のように計算される。

$$\begin{aligned}\Delta H^\circ &= \Delta H^\circ(rAG/dCT) + \Delta H^\circ(rGC/dGC) + \Delta H^\circ(rCC/dGG) \\ &\quad + \Delta H^\circ(rCG/dCG) + \Delta H^\circ(\text{開始}) \\ &= -9.1 - 8.0 - 9.3 - 16.3 + 1.9 \\ &= -40.8\end{aligned}$$

【0027】同様に、エンタルピー変化 ΔS° 、自由エネルギー変化 ΔG°_{37} 、及び T_m は、表1のパラメータ★値を用いて次のように計算される。

$$\begin{aligned}\Delta S^\circ &= \Delta S^\circ(rAG/dCT) + \Delta S^\circ(rGC/dGC) + \Delta S^\circ(rCC/dGG) \\ &\quad + \Delta S^\circ(rCG/dCG) + \Delta S^\circ(\text{開始}) \\ &= -23.5 - 17.1 - 23.2 - 47.1 - 3.9 \\ &= -114.8 \\ &\approx -115 \\ \Delta G^\circ_{37} &= \Delta G^\circ(rAG/dCT) + \Delta G^\circ(rGC/dGC) + \Delta G^\circ(rCC/dGG) \\ &\quad + \Delta G^\circ(rCG/dCG) + \Delta G^\circ(\text{開始}) \\ &= -1.8 - 2.7 - 2.1 - 1.7 + 3.1 \\ &= -5.2 \\ T_m &= [\{ R \ln(C_i/4) + \Delta S^\circ \} / \Delta H^\circ]^{-1} - 273.15 \\ &= [\{ 1.9872 \times \ln(100 \times 10^{-6}/4) - 114.8 \} / (-40.8 \times 10^3)]^{-1} - 273.15 \\ &= 300.3 - 273.15 \\ &= 27.17 \\ &\approx 27.2\end{aligned}$$

【0028】このようにして本発明による表1のパラメータを用いて計算した結果を前述の表4にカッコで示す。計算値と測定値との平均誤差は、 ΔH° に対しては $\pm 7.5\%$ 、 ΔS° に対しては $\pm 8.5\%$ 、 ΔG°_{37} に

しては±7.0%、T_mに対しては±2.1℃であり、表1に示した最近接塩基対パラメータ値が極めて有効であることが分かる。

【0029】本発明によるパラメータ値と従来のパラメータ値の比較のために、 ΔG°_{37} の実測値と、表1に示した最近接塩基対パラメータを用いた計算値、Freierの

パラメータ [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9373-9377(1986)]を用いた計算値、Von Hippelによるパラメータ [Biochemistry 30巻, 1097-1118頁(1991)]を用いた計算値を並べて表5に示す。

【0030】

〔表5〕

オリゴヌクレオチド配列 測定値 本実施例 Freier's Von Hippel's

AGCCG	-5.7	-5.2	-6.6	-7.4
CGGCU	-4.9	-5.1	-6.6	-7.4
GGUGG	-5.2	-5.4	-6.3	-6.2
ACCGCA	-6.4	-6.4	-8.8	-9.1
CAAUCG	-3.3	-2.9	-4.5	-5.9
CACGGC	-6.9	-7.2	-8.8	-9.1
CGAUUG	-2.6	-2.6	-4.5	-5.0
CGGUGC	-7.0	-6.9	-8.8	-9.1
CGUGCC	-6.3	-6.1	-8.8	-9.1
GCACCG	-6.2	-6.4	-8.8	-9.1
GGCACG	-7.3	-7.2	-8.8	-9.1
AAUACCG	-4.7	-5.3	-6.5	-8.4
ACGUAUG	-5.0	-4.9	-6.6	-7.6
AGCUUCA	-4.7	-4.9	-8.4	-7.1
CACGGCU	-8.5	-8.1	-10.5	-10.8
CAUACGU	-4.3	-4.2	-6.6	-7.6
GGACUUA	-4.9	-4.9	-7.6	-6.7
UAAGUCC	-5.4	-5.0	-7.6	-7.6
UGAAGCU	-6.4	-6.2	-8.4	-8.0
AAAAAAA	-3.8	-3.9	-2.9	-6.1
AAGCGUAG	-7.8	-7.6	-9.5	-10.5
AAUCCAGU	-6.1	-6.2	-9.2	-9.3
AAUGUCGC	-7.2	-7.4	-10.0	-10.5
ACCUAGUC	-6.9	-7.0	-10.5	-9.7
ACGACCUC	-8.6	-8.6	-12.0	-11.3
ACUGGAUU	-7.2	-6.8	-9.2	-8.4
AGCGUAAG	-7.3	-7.6	-9.5	-10.5
AGUCCUGA	-6.7	-7.2	-11.4	-10.1
CAACAGCA	-7.8	-7.2	-10.1	-9.7
CACGGCUC	-9.6	-9.6	-12.8	-12.5
CGCUGUAA	-7.2	-6.5	-9.6	-10.5
CUACGCUU	-6.8	-6.0	-9.5	-9.6
CUAGUGGA	-8.3	-7.1	-10.2	-9.7
CUCACGGC	-9.6	-9.6	-12.8	-12.5
CUGAGUCC	-7.8	-7.2	-11.4	-10.1
CUUACGCU	-6.4	-6.0	-9.5	-9.6
GACUAGGU	-8.1	-7.6	-10.5	-9.7
GAGCCGUG	-9.5	-9.2	-12.8	-12.5
GAGGUCGU	-9.2	-8.3	-12.0	-11.3
GCCAGUUA	-7.2	-6.3	-10.5	-9.6
GCCGUGAG	-9.7	-9.2	-12.8	-12.5

17				18
CGGACAUU	-7.9	-6.7	-10.0	-9.6
UAACUGGC	-8.6	-8.7	-10.5	-10.5
UCCACUAG	-6.9	-6.8	-10.2	-9.7
UGCUGUUG	-6.7	-6.6	-10.1	-8.8
UGUUCGAC	-7.4	-6.4	-10.1	-8.8
UUACAGCG	-7.0	-6.9	-9.6	-9.6
UUGGCACC	-8.7	-9.4	-12.4	-11.2
AUAACUGGC	-8.7	-9.6	-11.4	-11.8
AUCUAUCCG	-6.8	-7.0	-10.7	-11.8
CAACAGCAA	-8.7	-8.2	-11.0	-11.0
CAACAGCAU	-9.0	-8.1	-11.0	-11.0
CGCUGUAC	-8.2	-7.8	-11.7	-11.3
CGCUGUAG	-8.0	-7.5	-11.3	-11.3
CUAACAGCG	-9.0	-8.6	-11.3	-12.2
GCCAGUUA	-7.7	-7.3	-11.4	-10.9
GUAACAGCG	-9.1	-8.8	-11.7	-12.2
UUAACUGGC	-8.9	-8.9	-11.4	-10.9
ACGUUUUAUGC	-9.1	-9.3	-12.9	-13.5
GCAUAAUACGU	-10.0	-9.4	-12.9	-14.4
AAUGGAUUACAA	-10.2	-10.3	-13.1	-13.6
AUUGGAUACAAA	-10.8	-10.3	-13.1	-13.6
GUCAGGAUUCUG	-11.4	-12.3	-17.3	-16.1
UUGUAAUCCAUI	-8.5	-7.9	-13.1	-12.7
CACAG	-3.2	-2.6	-4.0	-3.8
CUGUG	-2.9	-2.1	-4.0	-3.8
CAACCAACCAAC	-15.9	-13.1	-16.8	-16.9
CUUCCUUCUUC	-9.9	-8.9	-17.1	-14.2
GAAGGAAGGAAG	-17.4	-15.0	-17.1	-16.9
GUUGGUUGGUUG	-15.5	-11.4	-16.8	-14.2
平均誤差 (%)		7.0	24.5	24.6

【0031】表5から明らかなように、従来の Freier のパラメータを用いた予測値及び Von Hippel のパラメータを用いた予測値と実測値との平均誤差は各々24.5%及び24.6%である。これに対して、表1のパラメータを用いて本発明の方法で予測した値は、実測値との平均誤差が7.0%であり、実験誤差(±8~10%)を考慮すると両者は極めてよい一致を示すことが分かる。

【0032】また、表1に示す値の代わりに前記表2に示す範囲内の値を用いても、精度は若干低下するものの充分満足すべき精度でオリゴリボヌクレオチド／オリゴデオキシリボヌクレオチドの相補塩基対構造の安定性を予測することができる。あるいは、表1に示す値を中心にその±10%の範囲内の値を用いても充分満足すべき

精度でオリゴリボヌクレオチド／オリゴデオキシリボヌクレオチドの相補塩基対構造の安定性を予測することができる。

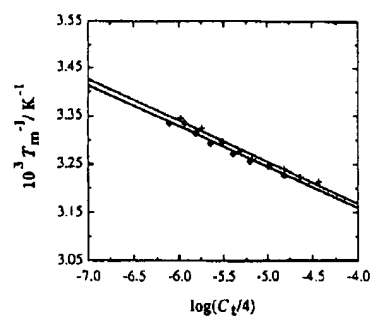
【0033】

【発明の効果】本発明によれば、オリゴリボヌクレオチドとそれに相補なオリゴデオキシリボヌクレオチドとが相補塩基対構造を形成するときの安定性を予測することができ、これは、核酸をもとにした医薬、診断薬、及び検出薬やそれらの方法の開発に有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 r (CUUACGCU) / d (AGCGTAA G) からなる8量体の二重鎖と、 r (CUACGCU U) / d (AAGCGTAG) からなる8量体の二重鎖についての実験結果をプロットした図。

【図1】



* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2. **** shows the word which can not be translated.

3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The maximum contiguity base pair parameter shown in a table 1 is used, and it is N1N2... How to predict the structural stability of complementary base pair structure of the oligo ribonucleotide / oligodeoxyribonucleotide characterized by asking for change of enthalpy accompanying formation of complementary base pair structure of oligo ribonucleotide expressed with Nn, and oligodeoxyribonucleotide which has a complementary base sequence in it, entropy, or free energy according to a degree type (1).

$$\sum_{i=1}^{n-1} \{ X (N_i N_{i+1}) \} + Y \quad (1)$$

However, nickel (n: [i= 1, 2, --,] n is a positive integer) Either of four sorts of bases A, G, C, and U which constitute oligo ribonucleotide is expressed. X (NiNi+1) (i= 1, 2, --, n-1) It is the value of a parameter shown in enthalpy accompanying complementary base pair structure formation with oligodeoxyribonucleotide of a dimer complementary to a base sequence of an oligo ribonucleotide NiNi+1 and this nucleotide of a dimer, entropy, or a table 1 to change of free energy. The sum shown by sigma means taking the sum of an individual (n-1) of X (N1N2), X (N2N3), --, X (Nn-1Nn). Moreover, in case Y asks for change of enthalpy, entropy, or free energy, respectively, it is a value which is used for each and which is displayed as initiation into a table 1. For an unit of a value which r expressed ribonucleotide, d expressed deoxyribonucleotide, the start expressed a five prime end side, and, as for how to locate a base in a line, the back expressed a three-dash terminal side in a table 1, and was shown in a table 1, deltaH degree . kcal mol-1 and deltaS degree cal mol-1k-1 and deltaG degree37 It is kcal mol-1.

[A table 1]

** A train deltaH degree deltaS degree deltaG degree37 ----- rAA/dTT - 7.8 - 21.9 - 1.0 rAC/dGT - 5.9 - 12.3 - 2.1 rAG/dCT - 9.1 - 23.5 - 1.8 RAU/dAT - 8.3 - 23.9 - 0.9 RCA/dTG - 9.0 - 26.1 - 0.9 rCC/dGG - 9.3 - 23.2 - 2.1 RCG/dCG - 16.3 - 47.1 - 1.7 RCU/dAG - 7.0-19.7 - 0.9 RGA/dTC - 5.5 -13.5 -1.3 RGC/dGC - 8.0-17.1 -2.7 rGG/dCC -12.8-31.9-2.9 rGU/dAC -7.8-21.6 - 1.1 RUA/dTA -7.8 - 23.2-0.6 rUC/dGA - 8.6 -22.9 - 1.5 rUG/dCA -10.4 -28.4-1.6 rUU/dAA -11.5 -36.4 -0.2 Open ** 1.9 -3.9 3.1 [Claim 2]

It is a method of predicting the structural stability of complementary base pair structure of the oligo ribonucleotide / oligodeoxyribonucleotide indicated to claim 1 -- As said value of X (NiNi+1) (i= 1, 2, --, n-1) and Y How to predict the structural stability of complementary base pair structure of the oligo ribonucleotide / oligodeoxyribonucleotide characterized by using a numeric value between maximum number values shown in a table 2 instead of and the minimum numeric values. [a numeric value shown in a table 1] In addition, for an unit of a value which r expressed ribonucleotide, d expressed deoxyribonucleotide, the start expressed a five prime end side, and, as for how to locate a base in a line, the back expressed a three-dash terminal side in a table 2, and was shown in a table 2, deltaH degree . kcal mol-1 and deltaS degree cal mol-1k-1 and deltaG degree37 It is kcal mol-1.

[A table 2]

** A train deltaH degree deltaS degree deltaG degree37 ----- rAA/dTT - 8.1--7.5 - 23.2--20.6 - 1.1--0.9 rAC/dGT - 6.2--5.6 - 13.6--11.0 - 2.2--2.0 rAG/dCT - 9.4--8.8 - 24.8--22.2 - 1.9--1.7 rAU/dAT - 8.6--8.0-25.2--22.6-1.0--0.8 rCA/dTG - 9.3--8.7-27.4--24.8-1.0 - -0.8 RCC/dGG - 9.6--9.0-24.5--21.9 - 2.2 - -2.0 RCG/dCG -16.6--16.0 -48.4--45.8 - 1.8--1.6 RCU/dAG -7.3--6.7 - 21.0--18.4 - 1.0--0.8 rGA/dTC - 5.8--5.2 - 14.8--12.2 - 1.4--1.2 rGC/dGC-8.3--7.7 - 18.4--15.8 - 2.8--2.6 RGG/dCC -13.1--12.5 -33.2--30.6 - 3.0--2.8 rGU/dAC - 8.1--7.5-22.9--20.3 - 1.2--1.0 RUA/dTA - 8.1--7.5-24.5--21.9 -0.7--0.5 RUC/dGA -8.9--8.3 - 24.2--21.6 - 1.6--1.4 rUG/dCA-10.7--10.1-29.7--27.1 -1.7--1.5 rUU/dAA -11.8--11.2 -37.7--35.1 -0.3 - -0.1 open ** 1.6-2.2 -5.2--2.6 3.0-3.2

[Translation done.]